

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-236108

(43)Date of publication of application : 23.08.2002

(51)Int.CI. G01N 27/447
G01N 1/00
G01N 1/10
G01N 27/62
G01N 27/64
G01N 35/10

(21)Application number : 2001-033259

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 09.02.2001

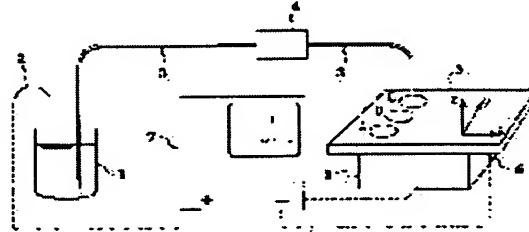
(72)Inventor : MASUJIMA TSUTOMU
OSHIMA NORIYUKI

(54) METHOD AND DEVICE FOR ISOLATING SAMPLE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and a device that can positively isolate a sample separated or conveyed by electrophoretic force, regardless of many components or a trace quantity, and provide an analysis method combined with a mass spectrometry for analyzing the components separated by electrophoresis, and a device for the method.

SOLUTION: In this method and device for isolating the sample, liquid drops are formed on a conductive isolation table 5, and the open end of an electrophoresis tube 3 is brought into contact with the liquid drop to make the open end and the isolation table 5 conductive and to discharge the sample onto the isolation table 5 by components by electrophoretic force. The isolation table 5 serves also as a plate for a mass spectrometer, and the sample is discharged onto the plate by components by a sample isolating device and subjected to analysis.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.05.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

[Date of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-236108

(P 2 0 0 2 - 2 3 6 1 0 8 A)

(43) 公開日 平成14年8月23日 (2002. 8. 23)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード ⁸ (参考)	
G01N 27/447		G01N 1/00	101	K 2G058
1/00	101	1/10		G
1/10		27/62		K
27/62				F
		27/64		B

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全13頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-33259 (P 2001-33259)

(22) 出願日 平成13年2月9日 (2001. 2. 9)

特許法第30条第1項適用申請有り 2000年9月12日 社團法人日本分析化学会発行の「日本分析化学会 第49年会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 升島 努

広島県広島市西区古江東町1-75

(72) 発明者 尾島 典行

広島県広島市南区蟹屋町1-8-34 松林
ビル402号

(74) 代理人 100087631

弁理士 滝田 清暉 (外1名)

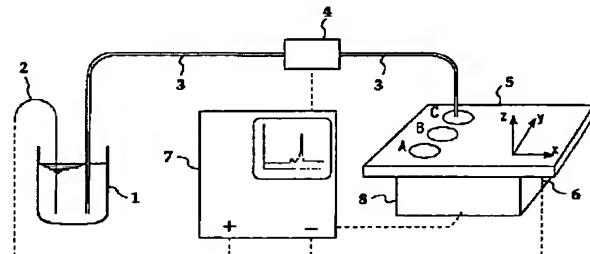
F ターム(参考) 2G058 CA01 EA03 EA14 EB00 GA06
GA20

(54) 【発明の名称】試料分取方法及びそのための装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 電気泳動力によって分離ないし搬送される試料を、多数の成分であっても、また微量であっても確実に分取することが可能な、分取方法および装置を提供する。更に、電気泳動により分離した成分を質量分析法と組み合わせた分析方法及びそのための装置を提供する。

【解決手段】 導電性の分取台5上に液滴を形成させて、電気泳動管3の開放端を液滴に接触させることにより開放端と分取台5とを導通させ、試料を電気泳動力により分取台5上に成分別に排出させる試料分取方法又は装置である。分取台5が質量分析装置用のプレートを兼ね、試料分取装置によりプレート上に試料が成分別に排出され、該分析にかけられる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】導電性の分取台上に液滴を形成させて、電気泳動管の開放端を該液滴に接触させることにより該電気泳動管内の泳動液と該分取台とを導通させ、試料を電気泳動力により該分取台上に成分別に排出させる試料分取方法。

【請求項2】前記電気泳動管に泳動する成分を検知する検知器を配置し、該検知器からの信号により該電気泳動管の末端又は該分取台を移動させることにより、所望の成分が該分取台の所望の位置に排出される請求項1に記載の試料分取方法。

【請求項3】前記分取台がMALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ね、該分取台上に請求項1又は2に記載の方法により試料が成分別に排出され、該排出された成分にマトリックスを混合した後MALDI-TOF質量分析にかけられることを特徴とする分析方法。

【請求項4】前記分取台がMALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ね、該分取台の所定位置に所定量のマトリックスが置かれ、このマトリックス上に請求項1又は2に記載の方法により試料が成分別に排出され、該排出された成分が該マトリックスと混合されてMALDI-TOF質量分析にかけられることを特徴とする分析方法。

【請求項5】電気泳動管及び導電性の分取台から成る試料分取装置であって、該分取台上に液滴を形成させて、電気泳動管の開放端を該液滴に接触させることにより該電気泳動管内の泳動液と該分取台とを導通させ、試料を電気泳動力により該分取台上に成分別に排出させる試料分取装置。

【請求項6】更に前記電気泳動管を泳動する成分を検知する検知器を備え、該検知器からの信号により該電気泳動管の末端又は該分取台を移動することが可能な請求項5に記載の試料分取装置。

【請求項7】請求項5又は6に記載の試料分取装置とMALDI-TOF質量分析装置とを組み合わせた分析装置であって、該分取台が該MALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ね、該試料分取装置により該プレート上に試料が成分別に排出され、該排出された成分がMALDI-TOF質量分析にかけられることを特徴とする分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、電気泳動法による試料分取方法及び試料分取装置に関し、更にこの方法又は装置を次段の分析処理と組み合わせた分析方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】キャピラリー電気泳動法(CZE法)は数10ミクロンの内径のキャピラリー(毛細管)の中の溶液に電場を印加したり、溶液中の試料の大きさや電気

的性質によって移動度が異なることを応用して混合された試料を分離する方法である。CZE法は非常に細いキャピラリーを使用するために、分子拡散などによる試料領域の分散をおさえることができ、非常に高い分解能で試料成分を分離することができる。また内容量が微小であるために微量分析に適している。また、電気クロマトグラフィーは、キャピラリーなどの内部にクロマトグラフィー用樹脂を充填し、極微量で、溶液試料内の分子を電気泳動力で駆動して、樹脂表面への分配や吸着などの相互作用と移動度の違いで、成分を分離する方法で、キャピラリー電気泳動法とは異なった微量分離法として注目されている。

【0003】この様な電気泳動力で混合物試料から分離された分子やイオン成分は、泳動電圧を印加しているときに泳動管の一端から成分毎に時間差をもって排出される。分離された成分が泳動管中の特定位置に来たときに紫外線吸収式などの検出器でその時刻を知ることができる。また、検出器を通過した時刻とその成分が泳動管の一端から排出されるまでの時間(排出時間)は泳動条件ごとにほぼ一定である。CZE法や電気クロマトグラフィーで分離された試料は、試料ごとに分析することによって各分離成分の組成や構造が解析される、このとき微量試料を容器に分注すると、容器壁等に試料が付着して失われ、分析に使用する試料の量が不足する問題がある。

【0004】このため、電気泳動により分離した微量成分を確実に分注するために、分離した成分を一旦回収液に溶解させて試験管に分注する技術が、例えば、特開平6-198173に開示されている。しかし、この方法には、多数の成分を対象にする分析の場合、多数の試験管が必要となり、試験管の識別や取扱いが煩雑になるという問題や、試料ごとに分析する前に濃縮操作が必要になるという問題がある。一方、電気泳動により分離した成分をそのまま質量分析装置にかけて分析するための装置も開発されている(特開平6-164741)。しかし、通常このような場合、電気泳動管の開放端の外周を導電性物質でコーティングしたり、開放端に金属のアッタチメントを付けて、電気泳動力を電気泳動管の開放端まで及ぼさせる工夫をしているが、コーティングの被膜が剥れたり、アッタチメントの導電性にムラが生じたりして、泳動された成分を安定して一点に確実に集めることができないという問題があった。

【0005】一方、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化法(MALDI法)はマトリックスと呼ばれる非常に良く光を吸収する分子と試料化合物を混合し、レーザー光によって試料をイオン化する方法であり、パルスレーザー照射により、マトリックス分子に大きなエネルギーが与えられ、マトリックスや試料化合物イオンが脱離する。一方、飛行時間質量分析法(TOF/MS法)は、このイオンに逆電場を印加し、イオンが電極表面か

ら検出器まで到達する時間を測定することで質量を決定する。このMALDI法は試料に大きな負担をかけることなくイオン化できるので、高質量の物質のイオン化が行え、またTOF/MS法は測定の質量範囲に制限がないため、これらを組み合わせたマトリックス支援型レーザー脱離イオン化一飛行時間質量分析法（以下、「MALDI-TOF/MS法」という。）は高質量の質量分析に適している。

【0006】特に、タンパク質、ペプチド、DNA等の生体関連物質を分析するために、MALDI-TOF/MS法は低分子量から高分子量まで迅速に感度良く生体成分の分析を行うことができるため、MALDI-TOF/MS法をキャピラリー電気泳動法等の電気泳動法と組み合わせることで、多種類の物質を分離してから分析が行える汎用性の高い質量分析法ができると考えられる。しかし、従来の電気泳動法によるサンプル分取方法では微量なサンプルを確実にMALDI-TOF/MS法に送ることができないという問題があった。更に、MALDI-TOF/MS法は試料をマトリックスと混合してプレート上にロードするという前処理操作が必要なために、CE法と組み合わせたオンライン測定を行うのは困難であった。電気泳動により分離された試料をMALDI-TOF質量分析計に組み合わせる方法として、エレクトロスプレーイオン化法を用いて、サンプルプレートにスプレーする方法があるが、試料が拡がり、濃く取れず、特に試料が微量な時には有効でない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、電気泳動法や電気クロマトグラフィーなどのように電気泳動力によって分離ないし搬送される試料を、多数の成分であっても、また微量であっても確実に分取することが可能な、分取方法および装置を提供することを目的とする。更に、このような方法及び装置を利用して、電気泳動により分離した成分をMALDI-TOF/MS法のような次段階の分析と組み合わせた分析方法及びそのための装置を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、導電性の分取台に泳動電圧の一方を印加し、これに反対電場の印加されているガラス細管など電気泳動担体の電場の印加されていない開放端（泳動担体開放端）を接触あるいは接近させ、電場で泳動あるいは飛散した溶液が液滴を形成するか、あるいはあらかじめ分取台の上に準備されていた微小体積の液滴との間で、分取台と泳動担体開放端を液滴で導通するようにして、泳動した溶液ないし成分をその液滴中に分取することにより、上記の課題を解決するものである。また、このような分取方法により電気泳動法により分離された微量な成分について、MALDI-TOF/MS法のような次段階の分析を確実に可能とするものである。

【0009】即ち、本発明の目的は、導電性の分取台上に液滴を形成させて、電気泳動管の開放端を該液滴に接触させることにより該開放端（正確には、電気泳動管内の泳動液）と該分取台とを導通させ、試料を電気泳動力により該分取台上に成分別に排出させる試料分取方法を提供することである。ここで電気泳動管内の泳動液と該分取台上の液滴とを導通させるわけであるが、この液滴による導通を確実にするために電気泳動管から分取台上へ金属繊維やガラス繊維等の導電性又は非導電性の補助棒を用いてもよい。また、本発明の別の目的は、前記電気泳動管に泳動する成分を検知する検知器を配置し、該検知器からの信号により該電気泳動管の末端又は該分取台を移動させることにより、所望の成分が該分取台の所望の位置に排出される上記の試料分取方法を提供することである。本発明の更に別の目的は、前記分取台がMALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ね、該分取台上に上記の試料分取方法により試料が成分別に排出され、該排出された成分がマトリックスを混合した後MALDI-TOF質量分析にかけられることを特徴とする分析方法を提供することである。本発明の更に別の目的は、前記分取台がMALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ね、該分取台上の所定位置に所定量のマトリックスが置かれ、このマトリックス上に上記の試料分取方法により試料が成分別に排出され、該排出された成分が該マトリックスと混合されてMALDI-TOF質量分析にかけられることを特徴とする分析方法を提供することである。本発明の試料分取方法によって分取台に成分別に排出された試料に、必要に応じて、種々の薬品（例えば、酵素処理、脱塩処理、濃縮処理等の処理を行うための薬品）を添加若しくは混合してもよい。このような操作は微量サンプルを有効に用いることを可能にするものである。

【0010】本発明のまた別の目的は、電気泳動管及び導電性の分取台から成る試料分取装置であって、該分取台上に液滴を形成させて、電気泳動管の開放端を該液滴に接触させることにより該開放端（正確には、電気泳動管内の泳動液）と該分取台とを導通させ、試料を電気泳動力により該分取台上に成分別に排出させる試料分取装置を提供することである。本発明の更に別の目的は、更に前記電気泳動管を泳動する成分を検知する検知器を備え、該検知器からの信号により該電気泳動管の末端又は該分取台を移動することが可能な上記の試料分取装置を提供することである。本発明のまた別の目的は、上記の試料分取装置とMALDI-TOF質量分析装置とを組み合わせた分析装置であって、該分取台が該MALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ね、該試料分取装置により該プレート上に試料が成分別に排出され、該排出された成分がMALDI-TOF質量分析にかけられることを特徴とする分析装置を提供することである。

本発明の試料分取装置によって分取台に成分別に排出さ

れた試料に、必要に応じて、種々の処理（例えば、酵素処理、脱塩処理、濃縮処理等）を行う装置を更に付加してもよい。このような装置を付加することにより微量サンプルを有効に用いることが可能になる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の試料分取方法は、導電性の分取台上に液滴を形成させて、電気泳動管の開放端を該液滴に接触させることにより該開放端（正確には、泳動液）と該分取台とを導通させ、試料を電気泳動力により該分取台上に成分別に排出させる。本発明に用いる分取台は導電性であり、金属、導電性有機若しくは無機材料、又は表面を導電性物質でコート若しくはプリントした非導電性材料等から成る。この分取台上に形成される液滴は水溶液又は導電性液体から成り、この液滴は、電場で泳動あるいは飛散した溶液により形成されたり、又は予め人手若しくは自動で分取台の上に液滴を形成しておくことにより準備する。

【0012】また、電気泳動管は導電性の極めて低い有機又は無機材質（例えば、溶融石英キャピラリー）から成り、電界をかける場としては溶液、濾紙、ゲル状物質、両性担体などがある。現在の技術では、本発明の電気泳動にはキャピラリー電気泳動又は電気クロマトグラフィーが該当する。本発明においては電気泳動管のこれらの物質がその開放端で露出し分取台上の液滴と接触することによりこれらが導通し、電気泳動管の他端の基準側電極と分取台との間に電界をかけることになり、電気泳動管中の試料が泳動して分離され成分ごとに分取台上の一点に確実に排出される。本発明で用いることのできる試料は、水溶液中あるいは極性溶媒中で、高圧電場の印加によって泳動する分子、例えば各種イオン、永久双極子あるいは誘起双極子を持つ有機分子、界面活性剤などの有機イオン会合体の中に分配される有機分子、タンパク質、核酸、糖あるいは、これらの複合体など、電気泳動により、分子構造に依存して、電気泳動液の中で、移動度を変えるものが、全て対象となる。この試料の分離は上記泳動管中のそれぞれの物質の移動度の違いによって定まるため、分取の目的に従って泳動条件を設定し、物質の移動度の差により排出端に泳動される時間を適宜設定して、分取することができる。

【0013】本発明においては、電気泳動管に検知器を備えて、泳動する成分を検知してもよい。この検知器としては特に制限はないが、泳動に影響を及ぼさないという観点から紫外若しくは可視光吸収検出器又はケイ光検出器等が挙げられる。また、この検知器を備える位置は、電気泳動管の排出端に近い側が好ましい。泳動条件により成分毎の泳動速度は一定であるので、この検知器で泳動する成分を検知した後、この成分が排出する時間を正確に予測することができる。従って、電気泳動により分離された成分が所望の分取台上の位置に排出されるように、分取台又は電気泳動管の末端を適当に移動させ

てもよい。上記検知器からの信号によってこれらを移動させるために通常の機械工学上の手段を用いればよい。

【0014】また、泳動管の一端と分取台とを垂直方向に相対的に移動させることにより、泳動管の開放端と分取台の接触・離反が可能となる。分取台が泳動電極の一方を構成しているので、接触ないし接液時は、泳動試料が分取台に排出される。泳動管と分取台とを離反させると、泳動電圧の印加がなくなるので、泳動管中の試料は泳動と排出が止まる。泳動管の開放端を分取台とを離反状態で水平方向に相対移動させると、分取台の相異なる場所に液滴を構成し、成分試料の分注が可能となる。これにより、一つの分取台の上に多成分試料が分注できるので、取扱いが容易確実となる。

【0015】このようにして本発明の試料分取方法又は装置により、電気泳動により分離した成分を成分ごとに確実に分取台上の一点に排出させることができるとなるが、次段階でこのような成分について様々な操作が可能であり、また様々な分析装置と組み合わせることにより様々な連続分析が可能となる。本発明の方法は、プレート上に分離成分をスポットするので、分離後（この手法の場合、完全分離の他、大まかな分離をも含む。）、消化酵素による蛋白質や核酸や糖鎖等の切断あるいは断片化による分子の一次構造解析、蛋白チップなどの抗原抗体反応あるいは生体分子の選択的結合を利用した、大まかな分子分離後の選択的な分子捕捉とマトリックス添加によるその捕捉分子の脱離と構造解析、大まかな分子分離後の遺伝子や核酸チップ上での相補的な結合による核酸のタピングと、マトリックス添加による脱離後のこれら分子の構造解析（この時、消化酵素も併用する場合がある）が、そのままプレート上で出来る。

【0016】また、本発明の試料分取方法又は装置と組み合わせることのできる分析装置及び方法には、例えば、MALDI-TOF質量分析法を用いたプロテインシクエンサー、DNAシークエンサー、生体成分分離同定システム、又は導電性基材（例えば、ダイアモンド薄膜等）の上に構成した遺伝子チップ、蛋白チップ若しくはアフィニティーチップ等が挙げられる。この中で特にサンプル台が導電性でなければならないものには特に本発明の方法が好適である。特に、MALDI-TOF/

MS法をキャピラリー電気泳動と組み合わせる場合には、MALDI-TOF質量分析装置用のプレートを兼ねた分取台に電気泳動により分離した成分を排出させるが、この分取台上の所定位置に所定量のマトリックスを予めスポット若しくは噴霧乾燥させて置くか又はマトリックス溶液の液滴を形成しておくと簡便に成分とマトリックスを混合できる。

【0017】MALDI-TOF/MSに通常用いられるレーザーはN₂レーザー（337nm）やEr-YAGレーザー（2940nm）であるが、Nd:YAG（1064nm）、色素（可視領域で波長可変）、YA

G-OPO (630 nm)、CO₂ (10600 nm)、アレキサンドライト (755 nm)、Ar (488~514 nm)、ホロミウム-YAG (20100 nm)などのレーザーも用いることが可能である。マトリックスとしては、励起光源(主に、パルスレーザー)の光を吸収する有機酸又は有機塩基を用いることができる。例えば、N₂ レーザー (337 nm) には、CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)、DHB A (2,5-dihydroxybenzoic acid)、3-HPA (3-hydroxypicolinic acid)、HABA (2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid)、シナピン酸 (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamic acid)、ピコリン酸 (picolinic acid) 等の有機酸、HARMAN (2-methyl- β -carboline; 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole)、HARMIN (2-methyl- β -carboline; 1-methyl-9-acetyl-pyrido[3,4-b]indole)、HARMOL (2-methyl- β -carboline; 1-methyl-9-hydroxy-pyrido[3,4-b]indole) 等の β -カルボリン、THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone monohydrate)、ATT (6-aza-2-thiothymine) 等のプリン、ピリミジン類(有機塩基)、コバルト超微細粒子(商品名Co-UFP)、多孔性シリカなどを用いることができる。また、Er-YAG レーザー (2940 nm) には、グリセロール、水、コハク酸などを用いることができる。

【0018】マトリックスの量は試料や目的に応じて適宜定めるが、多くの場合、結晶化を促進するためマトリックスの飽和濃度近くの含有機溶媒溶液として用いる。このようにプレート上でマトリックスと混合された成分を自然乾燥させるか又はデシケータ中等で乾燥した後、そのプレートをMALDI-TOF質量分析装置内に装着する。このように、MALDI-TOF/MS法をキャピラリー電気泳動と組み合わせることにより、前分離による分子同定と分子一次構造解析の同時解析のような従来考えられなかった高速の分子解析が可能になる。

【0019】以下、本発明を具体的に例証するが、本発明を制限する意図ではない。本発明の試料分取装置の一例を図1に示す。キャピラリー電気泳動において、混合物の試料、および溶媒(泳動液)は、試料を入れた容器1から順にキャピラリー3に導入される。このキャピラリーの内径は通常30~200 μ m程度である。泳動液としては、通常揮発性塩の例えは、0.01Mアンモニア・蟻酸アンモニウム緩衝液マイクロリッターが用いられる。そして、正負の電極2と6との間に電圧が印加される。この電圧は通常1~20 kV程度である。キャピラリー3内で混合物が電気泳動することによって、試料中の成分が分離し、各成分試料が通過したことが検出器4で検出される。その後一定時間の後に成分試料はキャピラリー3の一端から排出される。位置制御機構8は、上面に多数の試料載せ部をもったプレート5をXYの2軸方向に位置制御する機能を持っている。位置制御機構7は、板をXY方向に0.1 mm程度の再現性で、任意の

試料載せ部が作動範囲になるよう位置決めできるものであればよい。断続的に出てくる成分の時間間隔が短い場合があるので、高速で位置決めできるサーボ機構を持つものが好ましい。位置制御機構7は、さらにプレートの高さを昇降させる機能を持つ。細管とプレートとの関係が接触と離反の2位置に位置決めできるものであればよい。

【0020】計測・制御装置7は、正負の電極間に泳動電圧を供給する。また、検出器4の出力を変換して、分離成分の有無と通過時刻を計測する。さらに、位置制御機構8に指令して、プレートの位置・高さを変更する。プレート5の一例を図2に示す。このプレートは導電性の材質(例えば、金メッキステンレス、ステンレス、ダイアモンド薄膜等)で作成される。また、負電極6に泳動電圧配線が接続できるようになっている。この例では、5×5=25個のくぼみからなる試料載せ部があり、一度に混合物の25成分の連続分析が可能なものである。分取する試料が少量の場合は、くぼみが無くとも単なる平板でもかまわない。

【0021】本発明の分取方法の一例を、検出器出力(図3)及び図1を用いて説明する。本発明の分取方法は、まず分取台の上(A)に導電性の液体(泳動液)を液滴状に配置する。泳動用電極の一方を構成する導電性の分取台を移動させて(または細管の一端を移動させてもよい)、分取台上の液体と細管の一端を接液させると、電気泳動の電圧が印加されて泳動が始まる。検出器が成分を検出するまでは、(A)部の液は泳動液だけなので、図示しない装置で吸引除去する。最初に必要な分取成分(a)が検出され、排出時間が経過する前に相対的に移動させて(A)と細管との接液状態を解除する。このとき泳動が停止する、分取台または細管の一端を移動させて、分取台上の別の個所(B)と細管の一端を接触させると最初に必要な分取成分(a)は液滴(B)中に分取される。次に必要な成分(b)が検出されたとき、同様に排出時間が経過する前に接液状態を解除した後、別の個所(C)に接触させる。このようにして、相対的な移動を繰り返すことにより、複数の成分が同一の分取台上の相異なる位置に分取される。

【0022】各分離成分の組成や構造が解析するため40に、MALDI-TOF/MS法を用いる場合には、MALDI用のプレートを本発明のプレートと共に用いる形態としておくことが好ましい。また、予めMALDI用のマトリックスを分注位置のプレートに載せておくこともできる。こうすると電気泳動試料はマトリックス上に分注されるので、質量分析を連続的に行なうことができるので好都合である。本発明の分取された試料は、分取位置ごとに化学処理することができる。従って、分離成分ごとにプレート上で異なる処理を行なうことができ、自動化にも適している。

【0023】以上説明したキャピラリー電気泳動は、成

分分離方法の一例として示したものであって、成分が電気泳動により分離でき時間差を持って排出されるものであれば、本発明の方法や装置は電気クロマトグラフィー等他の分離方法や装置にも適用できる。さらに、本発明の試料の分取方法は、成分の分離を目的とした装置のみならず、電気泳動力が適用できる場合は微量成分の搬送にも用いることができる。例えば、図4に示すように、マイクロピペットなどで吸引した微量試料を細管中に保持し、細管の一旦を基準電極を設けた溶媒容器に浸漬させ、他端に本発明の分取台を用いれば、吸引試料ごとに分取台の上に吸引試料を分注することができる。この図の例では、キャピラリーの先は2連になっているが、連鎖的に何段階でも続けてサンプルを採取することが可能であり、キャピラリー先端はガラスキャピラリー全体のしなりを使うか、又は根本にテフロン（登録商標）チューブなどを結合して可動部を作つて、先端の位置を動かすことができる。このようにすれば、ピペットの吸引・排出を毎回同じ口から正逆方向に行なう従来のピペット採取方法にくらべ、多数の試料を短時間で連続的に分取することができる。

【0024】

【実施例】実施例1

2種類の蛋白質の電気泳動による分離と分注を行なうために、図1に示す測定系を用いた。容量1.5ccの容器1に、2種類の蛋白質、ミオグロビン（ウマ、Fw: 17.2kDa）1.7mgとリゾチーム（ニワトリ蛋白、Fw: 14.3kDa）1.4mgとを泳動液（20mMピリジン-NH₃溶液（pH8.0）1mlに混合溶解させた溶液を用意した。全長約60cmのキャピラリー3（溶融石英製、内径50μm）の一端を容器1中に浸す。分取台1として図2に示すような一端に電極を備えたMALDI用プレートを用いた。分取台5上の所望の位置に上記泳動液をスポットにて一滴垂らし、その液滴にこのキャピラリー3の他端を接液するよう配置した。またこのキャピラリー1の途中にUV検出器4（日本分光社製 E-800、測定波長280nm）を配し、キャピラリー1の外部から泳動する蛋白質を検出できるようにした。試料の導入端から検出器4までのキャピラリーの長さは約40cm、UV検出器4から分取台5までの長さを約20cmとした。容器1に正電極2を差し込み、分取台5から負電極6をとり、その両電極間に167V/cmの電場を印加した。図3には電場を印加してからのUV検出器による吸収を示す。図3中、

1. ミオグロビンaのトリプシンによる消化酵素処理によるアミノ酸配列決定

m/z (図6) アミノ酸配列

1333.5 CKG TDVQAWIR (115-125) : 配列番号1

1352.6 VFG RCE LAAAMK (2-13) : 配列番号2

2. ミオグロビンaのキモトリプシンによる消化酵素処理によるアミノ酸配列決定

m/z (図6) アミノ酸配列

aはリゾチーム、bはミオグロビンによる吸収ピークである。泳動を開始してからこれら蛋白質がUV検出器4で検出されるまでの時間から、試料が分取台5に排出される時刻を予測し、UV検出器4からの信号を計測・制御装置7を介することにより、30秒ごとに分取台5上の分注位置を位置制御機構8により変更して、蛋白質の検出が終わるまでの5分間連続して10区画の分離試料を作成した。

【0025】実施例2

10 実施例1で得た10区画の分離試料を風乾後、試料溶出部にマトリックスとしてα-シアノ-4-ヒドロキシアン酸（10mg/mL）溶液を1μL滴下した。この試料をMALDI-TOF/MSとしてPE Biosystems社製Voyager RPを用いて測定した。CZEによって、図3に示すようにa、b二つのピークが分離され、これらピークに相当する試料を質量分析した結果を図5に示すが、それぞれの質量分析から、最初のピークはリゾチーム（m/z 14, 311）、二番目のピークはミオグロビン（m/z 17, 237）が溶出されたものであることが同定できた。

【0026】実施例3

また、実施例1と同様に分離した成分a及びbに、それぞれ消化酵素処理を行つて、そのマススペクトルからシーケンス解析を行つた。後段のMALDI-TOF/MSは実施例2と同様に行つた。プレート上に溶出した試料（ミオグロビン（a）、リゾチーム（b））にそれぞれトリプシン及びキモトリプシンを加えて消化酵素処理を行つた後に、マトリックスとしてα-シアノ-4-ヒドロキシアン酸（10mg/mL）溶液を1μL加えて、そのマススペクトルデータからシーケンスを行つた。図6及び図7に示す質量分析の結果からミオグロビン及びリゾチームのアミノ酸配列を決定することができた。従来、数種の蛋白質が混合した試料に含まれる各蛋白質のアミノ酸配列を決定するためには各蛋白を精製するという別工程を経て質量分析すること必要であったが、本発明の方法を用いることによりこのような従来の複雑な工程を経ることなく、蛋白質の分離と質量分析を一工程で行なうことが可能になり、更にそのために極微量の試料によるこのような分析を確実且つ簡便に行なうことが可能になった。

40 【0027】以下、図6及び図7に示す質量分析の結果とそのアミノ酸配列を示す。なお、カッコ内の数字はミオグロビン又はリゾチームにおける塩基の順位を示す。

【0027】以下、図6及び図7に示す質量分析の結果とそのアミノ酸配列を示す。なお、カッコ内の数字はミオグロビン又はリゾチームにおける塩基の順位を示す。

11

12

6 9 4 . 8 V C A A K F (2 9 - 3 4) : 配列番号 3
 9 5 2 . 0 R G Y S L G N W (2 1 - 2 8) : 配列番号 4
 1 0 8 6 . 2 G I L Q I N S R W (5 4 - 6 2) : 配列番号 5
 1 2 7 2 . 4 G I L Q I N S R W W (5 4 - 6 3) : 配列番号 6
 1 7 3 0 . 0 S L G N W V C A A K F E S N F (2 4 - 3 8)
 : 配列番号 7
 2 1 0 6 . 3 R G Y S L G N W V C A A K F E S N F (2 1 - 3 8)
 : 配列番号 8

【0028】

3. リゾチーム b のトリプシンによる消化酵素処理によるアミノ酸配列決定

<u>m/z (図7)</u>	<u>アミノ酸配列</u>
6 6 1 . 7	A S E D L K (5 7 - 6 2) : 配列番号 9
7 4 7 . 9 .	A L E L F R (1 3 4 - 1 3 9) : 配列番号 1 0
1 6 0 5 . 9	V E A D I A G H G Q E V L I R (1 7 - 3 1) : 配列番号 1 1
1 7 3 0 . 0	H L K T E A E M K A S E D L K (4 8 - 6 2) : 配列番号 1 2

【0029】

4. リゾチーム b のキモトリプシンによる消化酵素処理によるアミノ酸配列決定

<u>m/z (図7)</u>	<u>アミノ酸配列</u>
8 2 7 . 9	D M A S N Y K (1 4 1 - 1 4 7) : 配列番号 1 3
9 5 6 . 1	K D M A S N Y K (1 4 0 - 1 4 7) : 配列番号 1 4
1 2 9 8 . 5	L F K G H P E T L E K (3 2 - 4 2) : 配列番号 1 5
1 5 0 9 . 7	T E A E M K A S E D L K K (5 1 - 6 3) : 配列番号 1 6
1 6 0 7 . 0	H G A T V L T A L G G I L K K K (6 4 - 7 9) : 配列番号 1 7
1 8 0 1 . 0	G L S D G E W Q L V L N V W G K (1 - 1 6) : 配列番号 1 8
2 0 3 5 . 3	F K H L K T E A E M K A S E D L K (4 6 - 6 2) : 配列番号 1 9
2 1 1 9 . 4	G H H E A E I K P L A Q S H A T K H K (8 0 - 9 8) : 配列番号 2 0
2 5 5 7 . 0	G H H E A E I K P L A Q S H A T K H K I P V K (8 0 - 1 0 2) : 配列番号 2 1
3 9 0 5 . 5	I P V K Y L E F I S E C I I Q V L Q S K H P G D F G A D A Q G A M N K (9 9 - 1 3 3) : 配列番号 2 2

【0030】

【発明の効果】本発明の試料分取方法および装置により、電気泳動法などによって分離された成分試料を同一の基盤上に連続的に分取することが可能となり、分取試料の分析操作が容易になった。また、分取台の位置によって試料成分を識別できるので、多数試料でも取扱いが容易である。更に、顕微鏡下で観察した特定の物質を採取することができる。また、回収液が不要であり、分離試料を液滴として直接分取するので、微量成分であっても確実に分注できる。また、電気泳動力を利用している

40 ので、微量試料の搬送が容易で確実に分注できる。これらは、ごく微量の試料に対応できる。分取された被測定試料に酵素処理、脱塩処理、濃縮処理等の処理が効果的にできる。さらに、本発明の試料分取方法および装置を他の分析装置と組み合わせることにより、超微量の分離液の分取が非常に簡便且つ確実に可能となり、分離を前提とした超微量での二次分析が安定且つ簡単に達成できる。

【0031】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 試料分取方法及びそのための装置

<130> PS01-966

13
 <160> 21
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 1
 Cys Lys Gly Thr Asp Val Gln Ala Trp Ile Arg
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 2
 Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 3
 Val Cys Ala Ala Lys Phe
 1 5
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 4
 Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp
 1 5
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 5
 Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg Trp Trp
 1 5
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 6
 Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg Trp Trp
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 7
 Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys Ala Ala Lys Phe Glu Ser Asn Phe
 1 5 10 15

15

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Allus gallus domesticus
 <400> 8

Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys Ala Ala Lys Phe Glu Ser
 1 5 10 15
 Asn Phe

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 9
 Ala Ser Glu Asp Leu Lys
 1 5
 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 10
 Ala Leu Glu Leu Phe Arg

1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 11

Val Glu Ala Asp Ile Ala Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 12

His Leu Lys Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Pro Glu Asp Leu Lys
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 13

Asp Lys Ala Ser Asn Tyr Lys
 1 5
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 14
 Lys Asp Met Ala Ser Asn Tyr Lys

17

5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 15

Leu Phe Lys Gly His Pro Glu Thr Leu Glu Lys

1

5

10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 16

Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys

1

5

10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 17

His Gly Ala Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys

1

5

10

15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 18

Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Asn Val Trp Gly Lys

1

5

10

15

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 19

Phe Lys His Leu Lys Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu

1

5

10

15

Lys

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 20

Gly His His Glu Ala Glu Ile Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr

1

5

10

15

Lys His Lys

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

19
 <213> Equus caballus
 <400> 21
 Gly His His Glu Ala Glu Ile Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr
 1 5 10 15
 Lys His Lys Ile Pro Val Lys
 20
 <210> 22
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 22
 Ile Pro Val Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Cys Ile Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gln Ala
 20 25 30
 Met Asn Lys
 35

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のオンプレート分注法の実施形態を示す図である。

【図2】本発明の分取台の一例を示す図である。(a)は正面図、(b)は側面図である。

【図3】泳動成分の検出器出力の一例を示す図である。

【図4】本発明のマイクロピペットによる搬送・分取の一例を示す図である。

【図5】各分画のマススペクトルを示す図である。図中、a及びbは図3のピークa及びbに相当する。

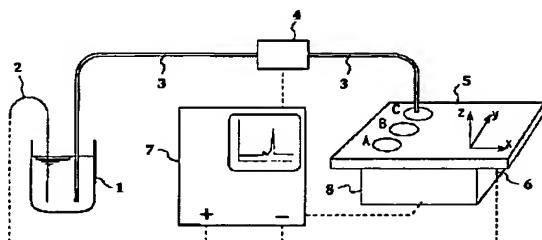
【図6】分画aの消化酵素処理を示す図である。

【図7】分画bの消化酵素処理を示す図である。

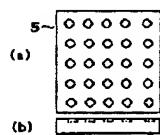
【符号の説明】

20 1 試料の入った容器
 2 正電極
 3 キャピラリー(細管)
 4 検出器(UV検出器)
 5 分取台
 6 負電極
 7 計測・制御装置
 8 位置制御機構

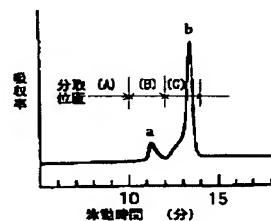
【図1】



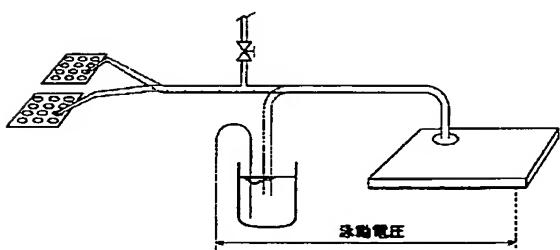
【図2】



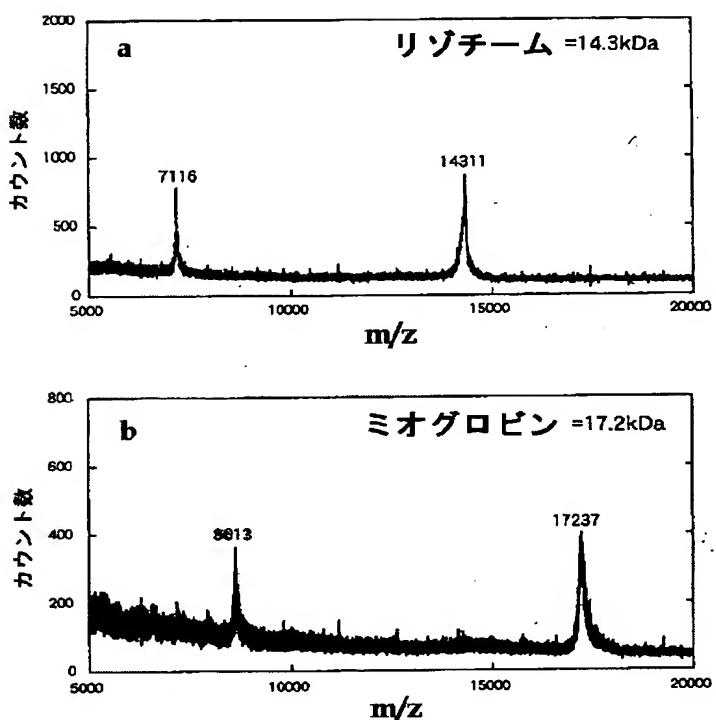
【図3】



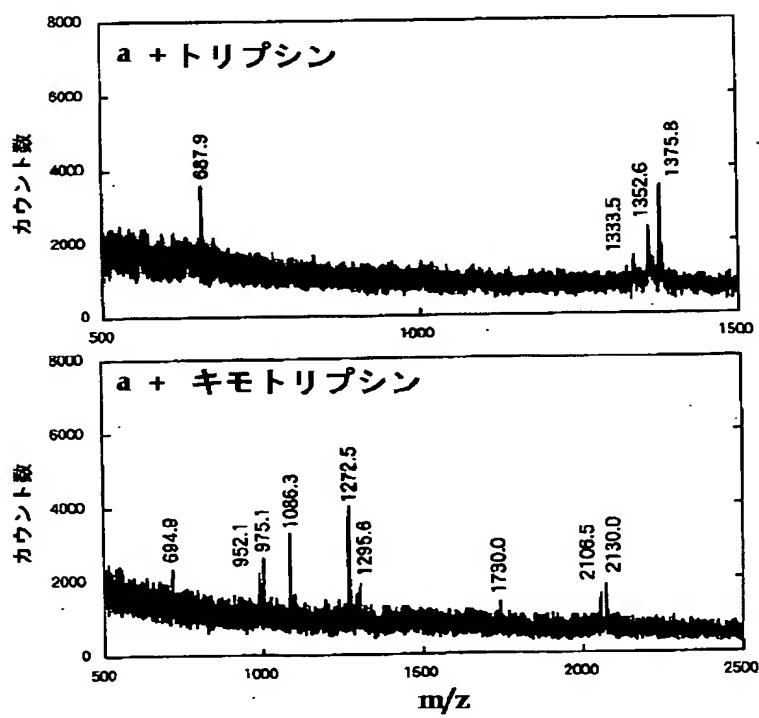
【図4】



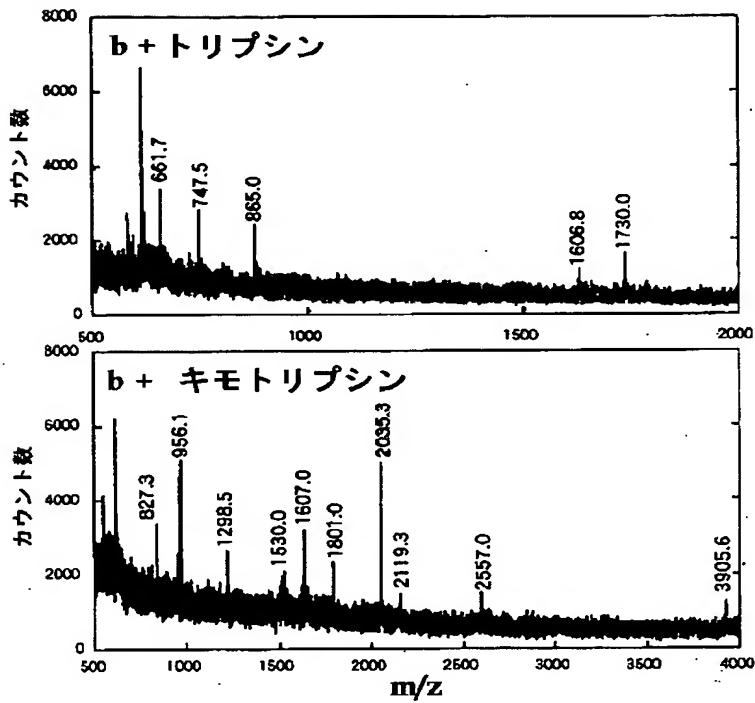
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

G 0 1 N 27/64
35/10

識別記号

F I

G 0 1 N 27/26
35/06

マークコード (参考)

3 3 1 C
3 3 1 E
3 3 1 J
A